

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

⑫ 特許公報(B2)

平5-43358

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭公告 平成5年(1993)7月1日

C 12 P 21/08
 G 01 N 33/577
 // C 12 N 5/20
 15/06
 G 01 N 33/53
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)

B

8214-4B
 9015-2J

S

8310-2J

7236-4B
 8828-4B

C 12 N 5/00
 15/00

B
 C

発明の数 2 (全7頁)

⑮発明の名称 抗T-2トキシンモノクローナル抗体及びこれを用いるT-2トキシン類の測定方法

⑯特 願 昭60-69170

⑰公 開 昭61-229899

⑱出 願 昭60(1985)4月3日

⑲昭61(1986)10月14日

⑳発 明 者 上 野 芳 夫 東京都板橋区高島平5-10-4
 ㉑出 願 人 宇 部 興 産 株 式 会 社 山口県宇部市西本町1丁目12番32号
 ㉒代 理 人 弁 理 士 津 国 肇
 審 査 官 内 田 俊 生
 ㉓参 考 文 献 Nature, 256, 495-497(1975)
 Appl. Environ. Microbiol., 37(1), 104-108(1979)

1

2

㉔特許請求の範囲

1 マウスのミエローマと、T-2トキシンをハプテンとした抗原であらかじめ免疫されたマウスからのリンパ球との細胞融合により形成されたハイブリドーマから産生される抗体であつて、ネオソラオニールおよびデオキシニバレノールとは実質的に反応せず、HT-2との交差反応性が約3%であり、T-2トキシンの検出感度が約25pg/アッセイである、抗T-2トキシンモノクローナル抗体。

2 マウスのミエローマと、T-2トキシンをハプテンとした抗原であらかじめ免疫されたマウスからのリンパ球との細胞融合により形成されたハイブリドーマから産生される抗体であつて、ネオソラニオールおよびデオキシニバレノールとは実質的に反応せず、HT-2との交差反応性が約3%であり、T-2トキシンの検出感度が約25pg/アッセイである、抗T-2トキシンモノクローナル抗体を用いるT-2トキシン類の測定方法。

発明の詳細な説明

[発明の属する技術分野]

本発明は、T-2トキシンに対して特異性の高いモノクローナル抗体及びそれを産生するハイブリドーマ及びそれらの製造方法並びにその抗T-2トキシンモノクローナル抗体を用いるT-2トキシンの測定方法に関するものである。

[従来の技術とその問題点]

T-2トキシン類は、フサリウム (*Fusarium*) 属のある種のものにより生産される有毒二次代謝産物である。T-2トキシンはマイコトキシンの中でも毒性の強いものの一つであり、現在では穀物、飼料や食肉などの汚染が問題となっている。

T-2トキシンを穀物あるいはその加工製品から検出する方法としては、TLCやGLC等が用いられており、最近では免疫測定法も試みられている。

さて免疫測定法で特異的にT-2トキシンを測定するためには特異性の高い抗体が必要であることは論ずるまでもない。

T-2トキシンのような低分子化合物に対する

抗体を作製する場合は、それ自身が免疫原性を持たないので、蛋白質などの高分子キャリアーと結合させてハプテン抗原となし動物に免疫するのが通常の方法である。又、T-2トキシンなどのトリコセセン系化合物の場合、その中の一種の化合物にのみ特異的な抗体を作製することは困難であり、通常得られる抗体はその化合物が属する群のその他の多くの化合物と交叉反応する場合が多い。

T-2トキシンに対する抗体の特性は、従来T-2トキシンをウシ血清アルブミン (BSA) に結合させたハプテン抗原でウサギを免疫して行ってきたが、得られた抗体の特異性は十分ではなく、T-2トキシン類全般に交叉反応を示した。このように特異性の高いT-2トキシンに対する抗体としては、これまでの多くの研究者の努力にもかかわらず未だ充分なものが得られていない。このため、穀類中のT-2トキシンの特異的な測定法の開発が要求されている折から、特異抗体の作製が強く待ち望まれている。

又、動物を免疫する都度に新たにハプテン抗原を作製する従来の抗血清の製造方法では、一般にハプテン抗原の作り方や動物の固体差、免疫の仕方によつてその都度力価、特異性、抗体サブクラスの異なつた抗体が得られるため、測定試薬に応用した場合、測定結果に微妙な影響が生じる。

【発明の目的】

本発明の目的は、T-2トキシンに対し特異性の高いモノクローナル抗体を提供するとともに、該モノクローナル抗体を用いてT-2トキシン類を精度良く測定し得る方法を提供することにある。

【発明の概要】

本発明者らは、ハプテン抗原を用いて免疫すれば、動物の免疫担当臓器、主に脾臓における多数の抗体産生クローンの中から目的の抗原に特異的な抗体を産生するクローンが出現するとの着想を得、クローニングによりその目的のクローンを選び出して単クローンとすることにより特異性の高い抗体の製法が確立出来ると考えて研究を進め、本発明を完成するに至つた。

マウスのみエローマと、T-2トキシンをハプテンとした抗原であらかじめ免疫されたマウスからのリンパ球との細胞融合により形成されたハイ

ブリドーマから産生される抗T-2トキシンモノクローナル抗体。

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明の目的を達成するための第一段階は、抗体を産生する新規な単クローンハイブリドーマを確立することである。このハイブリドーマを確立する方法の具体的な詳細は実施例で示すが、簡単には次の3工程から成る。

1 免疫

2 細胞融合

3 ハイブリドーマの選択と単クローン化 免疫

本発明において、T-2トキシンとしては、例えばフサリウム・スポロトリチオイデス (*Fusarium sporotrichioides*) の培養液より分離・精製したものを使用することができる。

T-2トキシンは単独では抗原になり得ないため、T-2トキシンを蛋白質と結合して免疫抗原とする。蛋白質としては、一般に入手できるものであれば特に選択の必要はないが、通常入手し易いウシ血清アルブミン (BSA) などが用いられる。この他に、卵白アルブミン (OVA)、陣笠貝ヘモシアニン (KLH) などを使用してもよい。T-2トキシンと蛋白質との結合には、自体公知の方法が有効に利用できる。

蛋白質との結合方法としては、T-2トキシンの水酸基に無水コハク酸を反応させて得られるT-2ヘミサクシネート (T-2-HS) のカルボキシル基を利用し、カルボジイミドで脱水縮合させるカルボジイミド法、酸無水物を利用する酸無水物法などがある。

免疫抗原が作製できたならば、次に免疫動物を選ぶ必要があるが、その選択は細胞融合に使用する腫瘍細胞株によつて決められる。一般にはラット、マウスが多く用いられる。マウスの中でも免疫グロブリンを産生しない腫瘍細胞株の確立されているBalb/Cがよく用いられる。

ハプテン抗原は、等張緩衝液或は生理食塩水などに溶解して使用するが、マウス一匹あたり1回に10 μ gから300 μ gを投与するのが好ましい。免疫は数回に分けて行うが、初回免疫はアジュバントと共に投与することが多い。アジュバントとしては、ミョウバン、結核死菌、核酸、フロイントアジュバントなどが使用される。免疫は2~4週

間隔で行い、最終免疫はアジュバントを使用せず生理食塩水等に溶解し腹腔内或は静脈内に投与する。

細胞融合

最終免疫後2～4日後にリンパ節或いは脾臓を摘出し、得られるリンパ球を細胞融合に供する。一方、細胞融合に使用される腫瘍細胞株としては、初期にはMPC-11、P3-X63-Ag8等があったがこれらは自身免疫グロブリンを産生するので、近來ではP3-X63-Ag8-UI、P3-NS-1及びSP2/0-Ag14(SP2/0)が汎用されている。

細胞融合時は、腫瘍細胞に比べリンパ球を5～20倍量多く用いる。DMEM培地、McCoy培地、RPMI1640培地又は等張緩衝液等で洗浄した腫瘍細胞とリンパ球とを混合後遠心分離し、ペレットとする。ペレットをほぐした後、HVJ(センダイウイルス)又は、ポリエチレングリコール(PEG)で細胞を融合させるが、一般には取扱いが便利な平均分子量1000～8000のPEG40～60%溶液を0.5～2 ml使用する。融合を促進するためにコルヒチン、ジメチルスルホキシド、ポリ-L-アルギニン等を添加することもあるが必須ではない。

PEG溶液で融合反応を1～10分間程度行なった後、DMEM培地又はRPMI1640培地等を10～50 ml徐々に加え融合反応を停止させる。停止後遠心し上清に除去する。ウシ胎児血清(FCS)を5～20%含むDMEM培地或いはRPMI1640培地を加え、24穴の培養プレートにリンパ球が1穴あたり $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個となるよう1 ml毎分注する。或いは96穴培養プレートにリンパ球が1穴あたり $1 \sim 2 \times 10^6$ 個となるよう0.1 ml毎分注する。両方共にフィーダー細胞は添加した方が好ましい。フィーダー細胞としてはラットの胸線細胞、脾臓細胞、マウスの胸線細胞、脾臓細胞等が用いられ、その濃度が $0.5 \sim 2 \times 10^6 / \text{ml}$ となるように添加する。次に、ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、アミノプテリン $4 \times 10^{-7} \text{M}$ 、チミジン $1.6 \times 10^{-5} \text{M}$ を含むRPMI1640培地(或いはDMEM培地)、即ちHAT培地に換えて行く。HAT培地交換の方法は一般には翌日培養プレートに融合時に分注した容量と等容量加え、更に翌日その半量をHAT培地と交換する。その後2～3日毎HAT培地で半

量ずつ交換する。融合後10～14日目にアミノプテリンを除いたHAT培地、即ちHT培地に半量交換し、更にその1～3日後より1～3日毎に培地の半量をHATを含まない通常の培地に交換する。

ハイブリドーマの選択と単クローン化

ハイブリドーマの増殖の盛んな穴の細胞培養上清を種々の分析法(例えばRIA、ブランク法、凝集反応、ELISAなど)で目的の抗体産生ハイブリドーマを選択する。ハイブリドーマを得たならクローニングを行う。クローニングの方法としてはFACS(Fluorescent Activated Cell Sorter)を用いたり、Soft Agarを用いてコロニーを拾い上げる方法の他に、一般によく用いられる限界希釈法などがある。クローニングはコロニーが一つのハイブリドーマから形成されるような細胞濃度で行なう。限界希釈法では96穴プレートの1穴あたり細胞が0.6個以下になるように行う。どの方法を用いてもクローニングは2回繰返し行ない、単クローンとする。

抗T-2トキシンモノクローナル抗体の産生

クローンを確立したなら抗体は大量にin vitroで培養するか、或いはin vivoで培養するかによって産生される。in vitroで産生された抗体は他の抗体の混入はないが抗体価は低い。in vivoで産生された抗体は宿主成分が若干混じるが、抗体価はin vitroに比し非常に高い。どちらの方法で抗体を産生させるかは目的による。

上記方法により、抗T-2トキシンモノクローナル抗体のT2.1、T2.2、T2.3、T2.4、T2.5及びT2.6が得られる。これら10種のモノクローナル抗体はいずれもT-2トキシンに対して高い特異性を有する。

T-2トキシン類の測定

抗T-2トキシンモノクローナル抗体を用いて特異的にT-2トキシンを測定するためには、通常RIA又はELISA等によって行う。ELISAに使用する時は標識酵素として β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼ等を用いることができる。

以下に実施例を挙げて更に詳細に説明するが、以下の実施例が発明の範囲を拘束するものではない。

[発明の実施例]

実施例 1

抗T-2トキシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び抗体の作製

(1) T-2ヘミサクシネート (T-2-HS) の作製

T-2トキシン50mgを無水ピリジン2mlに加え、溶解後さらにその溶液に無水コハク酸600mgを加え、80℃で2時間ヘミサクシニル化を行った。この操作によりT-2トキシンはT-2ヘミサクシネート (T-2-HS) に誘導された。次に、この反応液に2mlの蒸留水を加えて過剰の無水コハク酸を分解した後、等量のクロロホルムを加え、T-2-HS誘導体を抽出した。副反応物及び残存ピリジンを完全に除去する目的でこのクロロホルム溶液で蒸留水で10回洗浄し、クロロホルム溶液を減圧乾固し、T-2-HSを得た。

(2) 免疫抗原、分析用抗原の作製

ウシ血清アルブミン (BSA) 40mgを0.01Mリン酸緩衝食塩水 (PBS pH7.0) 4mlに溶解し、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDPC) 80mgを加えた。この溶液に、T-2-HS5mgをジメチルホルムアミド (DMF) 0.1mlに溶解したものを室温攪拌下、滴下した。

さらに、12時間室温攪拌を行った後、反応液を生理食塩水に対して透析し、非透析画分を2000r.p.m.で10分間遠心し、若干の不純物を沈殿させ、上清をT-2-HS-BSAの生理食塩水液とした。

またBSAの代わりに卵白アルブミン (OVA)、陣笠貝ヘモシアニン (KLH) を用いて、上記と同様の操作でT-2-HS-OVA、T-2-HS-KLHを作製した。

さらに、T-2-HSのかわりにオクラトキシンA (OTA) を用い、同様の操作でOTA-BSA、OTA-OVA、OTA-KLHを作製した。

(3) 免疫

T-2-HS-BSA2mgを溶解した生理食塩水1mlとフロイントの完全アジュバント1mlを混合してエマルジョンとし、その0.1mlをBalb/cマウス (雌性、4週齢) の背部皮内に投与した。10日後及び20日後、T-2-HS

-BSA10 μ gの生理食塩水溶液を腹腔内投与あるいは尾静脈に注射することにより追加免疫を行った。

(4) 細胞融合

最終免疫より3日後、マウスの脾臓を抽出し、10mlのMEM培地を入れたプラスチックシャーレ中で脾リンパ球をほぐした。脾リンパ球は、遠心操作 (1000回転、10分間) を繰返し、MEM培地で3回洗浄した。脾リンパ球1.8 \times 10⁸個と8-アザグアニン耐性ミエローマSP2/0-Ag14(SP2) 2 \times 10⁷個を混合し、1000回転、10分遠心してペレットとした。上清のMEM培地を吸引除去し、ペレットをほぐした。1mlの50%PEG 4000を1分間かけて加え、用いたピペットで攪拌しながら37℃で1分間反応させた。続いて1mlのDMEM培地を37℃のもと、1分間かけて加えた。同様の操作をもう1度行なった後、37℃に温めておいたDMEM培地7mlを2~3分間で加えた。直ちに、800回転で6分間室温にて遠心し、上清を除去した。次いで、37℃に温めていた20%ウシ胎児血清 (FCS)-DMEM培地30mlを加え、ペレットを懸濁させた。さらに30mlの20%FCS-DMEM培地を加えて良く懸濁させた後、96穴培養プレート7枚にこの懸濁液を1穴あたり0.1ml分注し、CO₂インキュベーター内で培養した。以下、細胞融合を行なった日を第0日として記述する。

(5) HAT選択

第1日に、HAT培地 (ヒポキサンチン1 \times 10⁻⁴M、アミノプテリン4 \times 10⁻⁷M、チミジン1.6 \times 10⁻⁵Mを含む20%FCS-DMEM培地) を1穴あたり0.1ml加えた。第2、3、5、8及び11日に培地の半分を吸引除去し、HAT培地0.1mlを加えた。以降3、4日毎にHT培地 (アミノプテリンを除いたHAT培地) を同様の操作で交換した。ハイブリドーマは全穴に増殖してきた。

(6) ハイブリドーマの選択

融合して2週間から3週間後までの間、3、4日毎に培養上清を各穴ごとに集め、ELISAにて分析した。

先ず、ELISAプレートにT-2-HS-KLH (2 μ g/100 μ l) を分注し、25℃で2時間

整地して抗原をプレートに固定化した。Tween20を0.05%含むPBSで3回洗浄した後、培養上清中の蛋白質の非特異的吸着を避けるため、卵白アルブミンOVA500 μ g/100 μ l)を分注し、25℃で1時間静置した。次に同上緩衝液で3回洗浄後、上記の各細胞培養上清を100 μ lを分注し、25℃で1時間静置した。一方、陰性対照として20%FCS-DMEM培地100 μ lを分注した。更に同上緩衝液で4回洗浄後、抗マウス免疫グロブリン抗体-アルカリ

フオスファターゼ複合体溶液100 μ lをプレートに分注し、室温にて1時間静置した。同上緩衝液で4回洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸2ナトリウム・6H₂O(1mg/ml)溶液を100 μ lずつ分注し、室温で30分間反応後、O.D.405nmを測定してアルカリフオスファターゼ活性を定量した。

同様にT-2-HS-BSA、T-2-HS-OVA、OTA-KLH、OTA-BSA、OTA-OVAをプレートに固定化してELISAを行い、T-2-HS-KLH、T-2-HS-BSA、T-2-HS-OVAに対して陽性、かつ、OTA-KLH、OTA-BSA、OTA-OVAに対して陰性を示した培養上清で増殖しているハイブリドーマを抗T-2トキシン抗体産生ハイブリド

ーマとして選択した。390穴中60穴に抗T-2トキシン抗体産生が認められた。さらに、真の抗T-2トキシン抗体産生ハイブリドーマを同定するために、遊離型T-2トキシンによる阻害試験を行った。すなわち、実施例1の5で述べたELISAの実験系で0.5 μ gのT-2トキシン存在下での各穴のT-2-HS-OVAに対する活性を測定し、T-2トキシ

ンで活性が阻害されるものを真の抗T-2トキシン抗体産生ハイブリドーマと決定した。抗T-2トキシン抗体産生ハイブリドーマは、最終的に35穴に認められた。

(7) 1mlへの培養スケールの拡大

どの穴で抗T-2抗体を産生しているかが判明したら、24穴培養プレートへ植え換え、1mlスケールでの培養を行った。この際、Balb/cマウスの胸線細胞を支持細胞として用いた。HT培地0.5mlを24穴培養プレートに分注す

る。それぞれの穴に1~2 $\times 10^7$ 個の胸線細胞を加える。これには4、5週齢のマウスから胸線を摘出し、少なくとも3回洗浄した後、胸線1個あたり1mlの20%FCS-DMEM培地に懸濁する。この懸濁液を50~100 μ lずつそれぞれの穴に加えればよい。それから、96穴培地プレートにおける抗体産生穴の細胞懸濁液を24穴培養プレートに移す。これを再懸濁し、そのうちの250 μ lを元の96穴培養プレートの穴にもどす。これが、複製となり、新しい細胞株の損失をふせぐことができる。

2、3日後、24穴培養プレートに20%FCS-DMEM培地0.5mlを加える(ここでは支持細胞は必要としない)。さらに2日後、上清を除き新しい培地を加える。細胞が、ほぼ全面に広がってきたら、抗体活性を再テストする。

もし引き続き抗体を産生しているようであれば即座にクローニングを行う。

もしも、抗体を産生している穴がそれほど多くなければ、96穴培養プレートで培養している段階から、直接クローニングをしてもよい。しかし、24穴培養プレートに植え換えてもなお抗体を産生しているものからクローニングすることにより、より不安定な株をクローニングするという無駄を省くことができる。

(8) モノクローン化

クローニング培地は、Balb/cマウスの胸線細胞を10⁷個/ml含んだ20%FCS-DMEM培地である。もし、クローニングを直接96穴培養プレートから行うときには、培地はHT培地を用いる。

抗T-2抗体産生ハイブリドーマを計数し、クローニング培地1ml中に10個の細胞が含まれるように希釈した。この懸濁液を100 μ lずつ、96穴培養プレート中の60穴に分注する。5日目に100 μ lの培地を加えた。14日目に、ELISAにより活性を測定し、活性のあるクローンを24穴培養プレートで増殖させた。さらに、同様の方法で再クローニングを行い、抗T-2トキシン抗体産生ハイブリドーマのクローンT2.1、T2.2、T2.3、T2.4、T2.5及びT2.6を得た。

(9) モノクローナル抗体の産生

モノクローナル抗体は培養上清中に10~50 μ g/ml分泌される。

T2.1ハイブリドーマを増殖させた後、ほとんど全てのハイブリドーマを死ぬ直前まで培養し、培養上清を回収した。

また、T2.1ハイブリドーマの 2×10^6 個をDMEM培地0.5mlに浮遊させ、Balb/cマウス(雌性、6週齢、あらかじめ3~10日前にプリスタン0.5mlを腹腔内投与しておいたもの)の腹腔内に投与し、腹水を回収した。

00 モノクローナル抗体のクラスの決定

それぞれのハイブリドーマクローンの産生する免疫グロブリンのクラスは、 γ クラスに特異的な抗血清(抗IgG1、IgG2a、IgG2b、IgM、IgA)を用いたオクトロニー法によって決定した。各ハイブリドーマの産生する抗体は、T2.1モノクローナル抗体をはじめとして、その多くがIgG1に属することが判明した。

実施例 2

モノクローナル抗体の特異性

抗T-2トキシンモノクローナル抗体の特異性を調べるため、各抗体のT-2-HS-OVAに対する結合反応がT-2トキシン及びその類縁体によってどの程度阻害されるかを検討した。

測定操作は実施例1の6のハイブリドーマの選択で記載した方法に準じた。

T2.1の産生するT2.1モノクローナル抗体は、T-2トキシンにより強く阻害されるが、HT-2ではさほど阻害されない。すなわち、次式：

$$\text{相対的結合阻害活性} = \frac{B}{A}$$

(Aは、T-2-HS-OVAと本発明の抗体との結合を50%阻害するのに必要なT-2トキシン類縁体の濃度；Bは、T-2-HS-OVAと本発明の抗体との結合を50%阻害するのに必要なT-2トキシンの濃度)

で求められる相対的な結合阻害活性をパーセントに変換したものが交差反応性であり、HT-2については、図から、

$$\text{交差反応性} = \frac{(\text{約} \ln 9 / \text{分析})}{(\text{約} 30 \ln 9 / \text{分析})} \times 100$$

=約3%

であることがわかる。また、ネオソラニオール及びデオキシニバレノールによつては全く阻害されない。

また、このT2.1抗体を用いたELISAによるT-2トキシンの検出感度はおよそ25pg/分析であつた(図参照)。

他のモノクローナル抗体についても同様の測定結果が得られた。

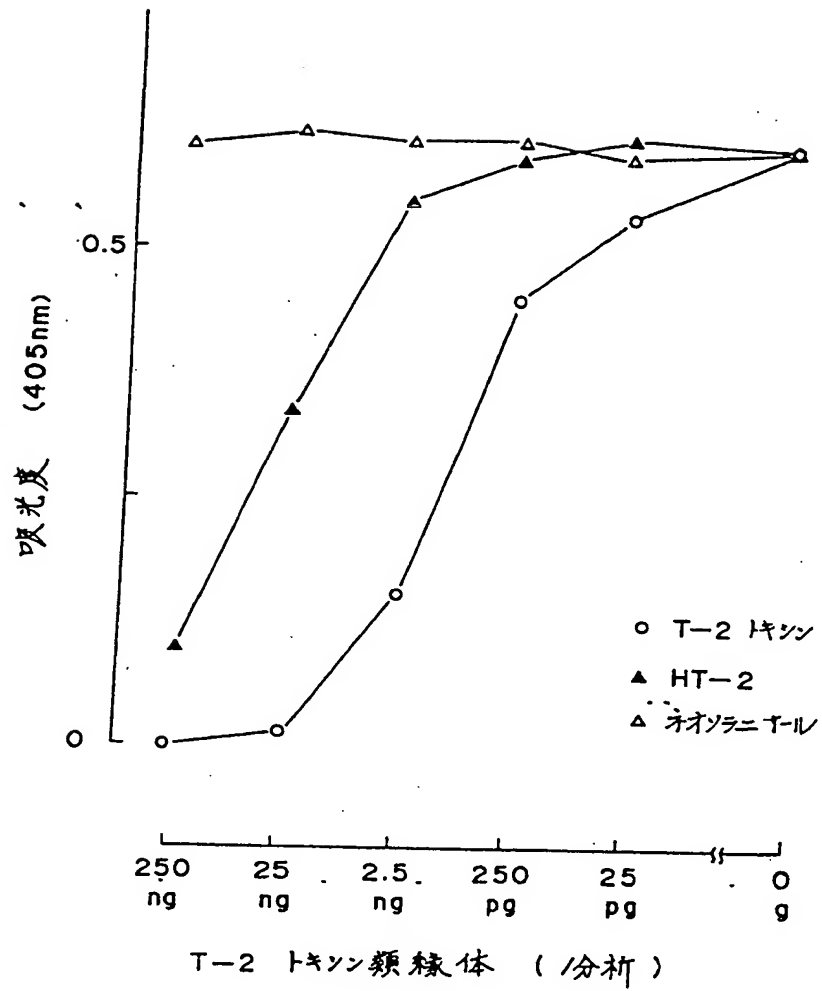
〔発明の効果〕

本発明により得られる新規なモノクローナル抗体はT-2トキシンと特異的に反応し、他のT-2トキシン類とはほとんど反応しない。したがつて、本発明のモノクローナル抗体を用いれば、T-2トキシンを精度良く高感度で測定することが可能になる。

更に、本発明ではハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生しているが、ハイブリドーマを培養さえしておけば、いつでも必要なときにモノクローナル抗体を得ることができ、しかも一定の特性を有するものが得られるため、動物を免疫する毎にハプテン抗原を調整する必要はなく、動物の固体差に影響されることなく常に安定した品質の抗体を得ることができる。

図面の簡単な説明

図は、T2.1モノクローナル抗体のT-2トキシン、HT-2及びネオソラニオールに対する交叉反応性を調べた結果を示したものである。



157 ANSWER 30 OF 35 WPIDS COPYRIGHT 1997 DERWENT INFORMATION LTD
 ACCESSION NUMBER: 86-309532 [47] WPIDS
 DOC. NO. NON-CPI: N86-231182
 DOC. NO. CPI: C86-134191
 TITLE: Anti-T-2-toxin-monoclonal antibody used in
 measurement of T-2-toxin - obtd. by cell fusion of
 mouse myeloma and lymphocyte cells.
 DERWENT CLASS: A96 B04 S03
 PATENT ASSIGNEE(S): (UBEI) UBE IND LTD
 COUNTRY COUNT: 1
 PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 61229899	A	861014	(8647)*	7	<--
JP 05043358	B	930701	(9329)	7	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 61229899	A	JP 85-69170	850403 <--
JP 05043358	B	JP 85-69170	850403 <--

FILING DETAILS:

PATENT NO	KIND	PATENT NO
JP 05043358	B Based on	JP 61229899

PRIORITY APPLN. INFO: JP 85-69170 850403
 AB JP61229899 A UPAB: 930922

Anti-T-2-toxin-monoclonal antibody is produced by hybridoma formed by cell fusion of (a) mouse myeloma cells and (b) mouse lymphocyte cells derived from mouse previously immunised with T-2-toxin-contg. hapten-antigen. Measurement of T-2-toxin or its analogues by the use of the anti-T-2-toxin-monoclonal antibody, is claimed.

T-2-toxin is isolated from a culture soln. of Fusarium sporotrichioides and purified. This is bonded to a protein carrier (e.g. bovine serum albumin) to obtain a hapten-antigen, and mouse is immunised. Spleen cells are isolated from the immunised mouse. These were blended with mouse myeloma cells in the presence of polyethylene glycol for cell fusion, whereupon feeder cells (e.g. mouse spleen cells) are pref. used, to obtain hybridoma cells, these are incubated in HAT medium.

USE/ADVANTAGE - The antibody has high specificity to T-2-toxin and its analogues and may be used for the measurement of such T-2-toxins.

0/0

Japanese Published Examined Patent Application
JP 05043358

Title of the Invention: Anti-T-2 toxin monoclonal antibody and assay method for T-2-toxins using the monoclonal antibody

Scope of Claims for Patent

1. An anti-T-2 toxin monoclonal antibody produced by a hybridoma formed by cell fusion of mouse myeloma cells and mouse lymphocyte cells derived from a mouse previously immunized with a T-2-toxin-containing hapten-antigen, said antibody being substantially nonreactive to neosolaniol and deoxynivalenol, and having a cross reactivity to HT-2 of about 3% and a T-2 toxins detection sensitivity of about 25 pg/assay.
2. An assay method for the detection of T-2 toxins using an anti-T-2 toxin monoclonal antibody produced by a hybridoma formed by cell fusion of mouse myeloma cells and mouse lymphocyte cells derived from a mouse previously immunized with a T-2-toxin-containing hapten-antigen, said antibody being substantially nonreactive to neosolaniol and deoxynivalenol, and having a cross reactivity to HT-2 of about 3% and a T-2 toxins detection sensitivity of about 25 pg/assay.

Detailed Explanation of the Invention

[Technical Field of the Invention]

The present invention relates to a monoclonal antibody which is highly specific to T-2 toxins; a hybridoma that produces the monoclonal antibody; a method for their production; and an assay method for detecting T-2 toxin using the anti-T-2 toxin monoclonal antibody.

[Prior Art and Problems]

T-2 toxins are toxic secondary metabolites produced by microorganisms of certain species of the genus *Fusarium*. T-2 toxin is one of those having a strong toxicity among mycotoxins and currently its contamination in grains, feed and meat has created

discussions.

For the detection of T-2 toxin in grains or their processed products, TLC and GLC have been used and in recent years, the immunoassay methods have also been attempted.

It is needless to say that an antibody having a high specificity is necessary to specifically determine T-2 toxin by the immunoassay methods.

In producing an antibody against low molecular compounds such as T-2 toxin, since such compounds do not have immunoantigenicity, the method normally used is to conjugate them to a high molecular carrier such as proteins to give a hapten-antigen before immunizing animals. In the case of trichothecene compounds including T-2 toxin, it is difficult to produce an antibody that is specific to only one of these compounds and the antibody usually obtained often undergoes a cross reaction with many other compounds of the same group to which the targeted compound belongs.

Heretofore, antibodies against T-2 toxin have been prepared by immunizing rabbits with a hapten-antigen obtained by conjugating T-2 toxin to bovine serum albumin (BSA). However, the obtained antibodies did not have sufficient specificity and showed a cross reaction with T-2 toxins in general. Thus, in spite of the efforts so far made by many researchers, there has not been obtained any highly specific antibody against T-2 toxin. As the development of a specific assay method for T-2 toxin in grains is currently required, preparation of a T-2 toxin-specific antibody is strongly expected.

According to the conventional methods for the production of antisera in which hapten-antigens are newly prepared every time animals are immunized, antibodies having a different titer and specificity and belonging to a different antibody subclass are obtained from time to time depending on the method of hapten-antigen preparation, individual difference of animals, and immunization method. Therefore, when they are applied to an

assay reagent, delicate influence is caused on the results of assay.

[Object of the Invention]

The purpose of the present invention is to provide a monoclonal antibody which is highly specific to T-2 toxin as well as a method that enables accurate assay for T-2 toxins using the monoclonal antibody.

[Brief Description of the Invention]

The present inventors formulated a concept that if a hapten-antigen is used for immunization, a clone that produces an antibody specific to a targeted antigen will be found among antibody-producing many clones in immunocompetent organs, particularly spleen of animals. They considered that a method for producing an antibody having a high specificity could be established by selecting the targeted clone by cloning, and obtaining a monoclonal and have made studies to this end. As a result, the present invention has been completed.

An anti-T 2 toxin monoclonal antibody produced by a hybridoma formed by cell fusion of mouse myeloma cells and mouse lymphocyte cells derived from a mouse previously immunized with a T-2 toxin-containing hapten-antigen.

The present invention is explained in more detail as follows:

The first stage to achieve the object of the present invention is to establish a novel monoclonal hybridoma that produces the antibody. While the detailed embodiment of the process to establish the hybridoma will be shown in Examples below, simply, the process comprises the following three steps:

1. Immunization
2. Cell fusion
3. Selection of hybridomas and cloning to obtain a monoclonal

Immunization

In the present invention, T-2 toxin isolated and purified from the culture liquor of *Fusarium sporotrichioides* may be used by way of example.

Since T-2 toxin independently cannot be an antigen, it is conjugated to a protein to form an immunoantigen. Any proteins may be used so long as they are generally available. Bovine serum albumin (BSA) that is readily available is usually used. In addition, ovalbumin (OVA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) may be used. For the conjugation of T-2 toxin to proteins, known methods can be efficiently used.

As the method for conjugating T-2 toxin to proteins, the carbodiimide method in which conjugation is effected by condensation by dehydration with carbodiimide using the carboxyl group of T-2 hemisuccinate (T-2-HS) formed by reacting the hydroxyl group of T-2 toxin with succinic anhydride, and the method using acid anhydrides may be mentioned.

When the immunoantigen is successfully prepared, then, it is necessary to select an animal for immunization, which is to be decided depending upon the tumor cells to be used for cell fusion. Generally, rats and mice are often used. Among mice, a Balb/C mouse for which tumor cells without producing immunoglobulin are established is usually used.

The hapten-antigen is used after dissolving it in an isotonic buffer or physiological saline and it is preferable to administer 10 µg to 300 µg/dose/mouse. Immunization is performed several times, initially often together with an adjuvant. As the adjuvant, alum, dead cells of tubercle bacillus, nucleic acids, and Freund's adjuvant are used. Immunization is carried out at 2 to 4 week intervals. The final immunization is performed by intraperitoneally or intravenously injecting the hapten-antigen dissolved in physiological saline without using any adjuvant.

Cell Fusion

Two to four days after the final immunization, lymph nodes or spleens are excised and the lymphocyte cells obtained are subjected to cell fusion. As the tumor cells used for cell fusion, initially MPC-11, P3-X63-Ag8, etc. were available. However, since they themselves produce an immunoglobulin, recently P3-X63-Ag8-U1, P3-NS-1 and SP2/0-Ag14 (SP2/0) are generally used.

In carrying out cell fusion, 5 to 20 times as much lymphocyte cells as the tumor cells are used. The tumor cells washed with DMEM, McCoy or RPMI1640 medium or isotonic buffer are mixed with lymphocyte cells and the mixture is centrifuged into a pellet. After breaking the pellet, cell fusion is effected using HVJ (Sendai virus) or polyethylene glycol (PEG). Usually, 0.5 to 2 ml of a 40 to 60% solution of PEG having an average molecular weight of 1000 to 8000, which is convenient to handle, is used. Colchicine, dimethyl sulfoxide, poly-L-arginine, etc. may be added to promote cell fusion, however, such addition is not essential.

After effecting cell fusion for about 1 to 10 minutes using PEG solution, 10 to 50 ml of DMEM or RPMI1640 medium is gradually added to terminate the fusion reaction. The reaction mixture is then centrifuged to remove the supernatant, followed by the addition of DMEM or RPMI1640 medium containing 5-20% fetal calf serum (FCS). The mixture is put into each well of a 24-well incubation plate in 1 ml portions so that each well contains 1×10^5 to 5×10^6 lymphocyte cells or of a 96-well incubation plate in 0.1 ml portions so that each well contains 1 to 2×10^6 lymphocyte cells. In both cases, feeder cells are preferably added. As the feeder cells, thymus cells and spleen cells of rat and mouse are used. They are added so that their concentration be 0.5 to 2×10^6 cells/ml. Next, the medium is gradually exchanged with RPMI1640 medium (or DMEM medium) containing 1×10^{-4} M hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin and 1.6×10^{-5} M thymidine, namely, HAT medium. Generally, the exchange is performed by adding the volume of HAT medium

equal to that put into each well of the incubation plate upon cell fusion on the next day and further exchanging half the volume with HAT medium on the day next to that of initial exchange. After that, half the volume is exchanged with HAT medium every 2 or 3 days. After 10 to 14 days of cell fusion, half the volume is exchanged with HAT medium without containing aminopterin, namely HT medium and 1 to 3 days thereafter, half the medium is exchanged with ordinary medium without containing HAT every 1 to 3 days.

Selection of hybridomas and cloning to obtain a monoclonal

Hybridomas producing the targeted antibody are selected by analyzing the cell culture supernatants of the wells showing active proliferation of hybridomas by various methods (e.g. RIA, the plaque method, agglutination reaction, ELISA, etc.). When the hybridomas are obtained, cloning is carried out. As the cloning methods, in addition to those using FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) and of picking up colonies using Soft Agar, the limiting dilution method which is frequently used may be mentioned. Cloning is performed at a cell concentration at which colonies are formed from one hybridoma. According to the limiting dilution method, the number of cells per one well must be less than 0.6 for a well of 96-well plate. In any of the methods, cloning is to be carried out two times to obtain a monoclonal.

Production of anti-T-2 toxin monoclonal antibody

Once a clone is established, an antibody is produced by massive incubation *in vitro* or by ordinary incubation *in vivo*. The antibody produced *in vitro* has a low antibody titer though free from the contamination of other antibodies, whereas that produced *in vivo*, though containing some host components, has a very high antibody titer compared to the former. Which method should be used depends on the purpose.

Anti-T-2 toxin monoclonal antibodies, T2.1, T2.2, T2.3, T2.4, T2.5 and T2.6, are obtained through the method described above. These 10 monoclonal antibodies each

have high specificity to T-2 toxin.

Assay for T-2 toxins

To specifically assay for T-2 toxin using anti-T-2 toxin monoclonal antibodies, usually RIA or ELISA is performed. When monoclonal antibodies are used for ELISA, β -galactosidase, alkaline phosphatase or peroxidase may be used as a labeling enzyme.

The present invention is explained in more detail referring to examples, which, however, do not limit the scope of the invention.

[Examples of the Invention]

Example 1

Preparation of anti-T-2 toxin monoclonal antibody-producing hybridoma and monoclonal antibodies

(1) Preparation of T-2 hemisuccinate (T-2-HS)

After adding 50 mg of T-2 toxin to 2 ml of dry pyridine for dissolution, 600 mg of succinic anhydride was added to the solution, followed by hemisuccinilation at 80°C for 2 hours, whereby T-2 toxin was converted to T-2 hemisuccinate (T-2-HS). To the reaction mixture was added 2 ml of distilled water to decompose an excess succinic anhydride and then an equal volume of chloroform was added to elute T-2-HS derivatives. The chloroform solution was washed 10 times with distilled water to completely remove side reaction products and residual pyridine and was evaporated to dryness under reduced pressure to obtain T-2-HS.

(2) Preparation of immunoantigen and antigen for assay

Forty milligrams of bovine serum albumin (BSA) was dissolved in 4 ml of 0.01M phosphate buffered saline (PBS pH 7.0) to which 80 mg of 1-ethyl-3-(dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDPC) was added. To this solution, a solution of 5 mg of T-2-HS in 0.1 ml of dimethylformamide (DMF) was added dropwise while stirring at room temperature.

After further stirring at room temperature for 12 hours, the reaction liquid was dialyzed against physiological saline. Undialyzed fractions were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes to precipitate some impurities and the supernatant was obtained as a physiological saline solution of T-2-HS-BSA.

The above procedures were repeated using ovalbumin (OVA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) in place of BSA to prepare T-2-HS-OVA and T-2-HS-KLH.

Furthermore, using ochratoxin A (OTA) in place of T-2-HS, OTA-BSA, OTA-OVA and OTA-KLH were prepared according to similar procedures.

(3) Immunization

An emulsion was prepared by mixing 1 ml of physiological saline in which 2 mg of T-2-HS-BSA was dissolved with 1 ml of Freund's complete adjuvant and 0.1 ml of the emulsion was administered subcutaneously to the back of Balb/c mice (female, 4 weeks of age). After 10 and 20 days, further immunization was performed by intraperitoneally administering or injecting to the tail vein, a physiological saline solution of 10 μ g of T-2-HS-BSA.

(4) Cell fusion

At day 3 after the final immunization, spleens of the mice were extracted and spleen lymphocytes were broken in a plastic dish containing 10 ml of MEM medium. The spleen lymphocytes were repeatedly centrifuged (1000 rpm, 10 minutes) and washed three times with MEM medium. The spleen lymphocytes (1.8×10^3 cells) and 8-azaguanine-resistant myeloma SP2/0-Ag14 (SP2) (2×10^7 cells) were mixed and centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes to give a pellet. The supernatant MEM medium was removed by suction and the pellet was broken, to which 1 ml of 50% PEG 4000 was added over one minute. The mixture was reacted at 37°C for 1 minute while stirring with the pipette used. Subsequently, 1 ml of DMEM medium maintained at 37°C was added thereto over one

minute. After repeating the same procedure one more time, 7 ml of DMEM medium warmed to 37°C was added over 2 to 3 minutes. Immediately after the addition, the mixture was centrifuged at 800 rpm at room temperature for 6 minutes to remove the supernatant, followed by the addition of 30 ml of 20% fetal calf serum (FCS)-DMEM medium warmed to 37°C to suspend the pellet. To the suspension was further added 30 ml of 20% FCS-DMEM medium to more fully suspend the pellet and 0.1 ml of the resulting suspension was put into each well of seven 96-well incubation plates. Incubation was performed in a CO₂ incubator. Throughout the following description, the day cell fusion was done is designated as day 0.

(5) Selection with HAT

At day 1, 0.1 ml/well of HAT medium (20% FCS-DMEM medium containing 1×10^{-4} M hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin and 1.6×10^{-5} M thymidine) was added. At days 2, 3, 5, 8 and 11, half the medium was removed by suction and 0.1 ml of HAT medium was added. Thereafter, the medium was exchanged with HT medium (HAT medium without containing aminopterin) every 3 and 4 days using similar procedures. As a result, hybridomas proliferated in all the wells.

(6) Selection of hybridoma

During the period between two and three weeks after cell fusion, incubation supernatant of each well was collected and assayed by ELISA.

First, T-2-HS-KLH (2 µg/100 µl) was put into an ELISA plate and allowed to stand at 25°C for 2 hours, whereby the antigen was immobilized on the plate. After washing three times with PBS containing 0.05% Tween20, ovalbumin (OVA) (500 µg/100 µl) was put into the plate to avoid non-specific absorption of proteins in the incubation supernatant, followed by standing at 25°C for 1 hour. Next, the plate was washed three times with the same buffer and 100 µl of the supernatant of each of the above cell cultures was put

thereto, followed by standing at 25°C for 1 hour. Separately, 100 µl of 20% FCS-DMEM medium was put into the plate as the negative control. After further washing 4 times with the same buffer, 100 µl of an anti-mouse immunoglobulin antibody-alkaline phosphatase complex solution was put into the plate, which was allowed to stand at room temperature for 1 hour. After washing 4 times with the same buffer, a p-nitrophenyl disodium phosphate·6H₂O (1 mg/ml) solution was put into the plate in 100 µl portions and reaction was carried out at room temperature for 30 minutes. Thereafter, the alkaline phosphatase activity was determined by measuring O.D.405nm.

In a similar manner, by immobilizing T-2-HS-BSA, T-2-HS-OVA, OTA-KLH, OTA-BSA and OTA-OVA on the plates and carrying out ELISA, hybridomas proliferating in the supernatants of which the assay shows positive relative to T-2-HS-KLH, T-2-HS-BSA, and T-2-HS-OVA and negative relative to OTA-KLH, OTA-BSA, and OTA-OVA, respectively, were selected as anti-T-2 toxin antibody producing hybridomas.

Anti-T-2 toxin antibody production was observed in 60 out of 390 wells.

Furthermore, to identify the genuine anti-T-2 toxin antibody producing hybridomas, an inhibition test by free T-2 toxin was carried out. More specifically, the activity of the hybridoma against T-2-HS-OVA in each well was assayed in the presence of 0.5 µg of T-2 toxin using the ELISA experimental system described in (5) of Example 1 and those whose activity was inhibited by T-2 toxin were determined as genuine anti-T-2 toxin antibody producing hybridomas. Anti-T-2 toxin antibody producing hybridomas were observed finally in 35 wells.

(7) Scale up to 1 ml-scale incubation

When the wells in which anti-T-2 antibody is produced were known, the cell suspension of each well was transferred to a 24-well plate and 1 ml-scale incubation was performed. Thymus cells of Balb/c mice were used as supporting cells.

0.5 ml of HT medium is put into each well of a 24-well incubation plate and $1 - 2 \times 10^7$ thymus cells are added to each. The thymus cell addition may be done by excising the thymus from the mice of 4 to 5 weeks of age, washing them at least 3 times, suspending in 20% FCS-DMEM medium (1 ml per one thymus) and adding 50 to 100 μ l of the resulting suspension to each well. Subsequently, the cell suspension in the antibody-producing well of the 96-well incubation plate is transferred to the 24-well incubation plate. The mixture is re-suspended and 250 μ l is put back to the former well of the 96-well plate, which serves as the reproduction. In this manner, the new cells can be protected from loss.

After 2 to 3 days, 0.5 ml of 20% FCS-DMEM medium is added to the 24-well plate (this time, the supporting cells are not necessary). After 2 more days, the supernatant is removed and new medium is added. When the cells proliferate all over the well, the antibody activity is re-tested.

If antibody production is continued, cloning is carried out immediately.

If there are not so many wells that contain produced antibodies, cloning may be performed directly from the 96-well plate incubation. However, by carrying out cloning of hybridoma cells that still produce the antibody after being transferred to 24-well plate, it is possible to eliminate the fruitless step of cloning more unstable cells.

(8) Obtaining monoclones

20% FCS-DMEM medium containing thymus cells of Balb/c mice (10^7 cells/ml) is used for cloning. However, if cloning is carried out directly from the 96-well plate, HT medium is used.

Anti-T-2 antibody producing hybridoma cells are counted and the cell concentration was adjusted by dilution so that 10 cells are contained in 1 ml of the cloning medium. 100 μ l of the suspension was put into each of 60 out of 96 wells of the incubation plate.

At day 5, 100 μ l of the medium was added. At day 14, the activity was assayed by ELISA and clones showing the activity were propagated on a 24-well incubation plate. Re-cloning was performed in a similar manner to obtain anti-T-2 toxin antibody producing hybridoma clones, T2.1, T2.2, T2.3, T2.4, T2.5 and T2.6.

(9) Production of monoclonal antibody

The monoclonal antibodies are secreted in the incubation supernatants in an amount of 10 to 50 μ g/ml.

After propagating T2.1 hybridoma, almost all the hybridomas were incubated just before their death and incubation supernatants were recovered.

2×10^6 cells of T2.1 hybridoma were floated in 0.5 ml of DMEM medium and intraperitoneally administered to Balb/c mice (female, 6 weeks of age, previously administered intraperitoneally with 0.5 ml of pristane 3 to 10 days before) and the ascites fluid was recovered.

(10) Determination of the class of monoclonal antibody

The class of immunoglobulins produced by the respective hybridoma clones was determined by the Ouchterlony's diffusion method using antisera specific to each class (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM and IgA). It was found that many of the antibodies including T2.1 monoclonal antibody produced by each of the hybridomas belong to IgG1.

Example 2

Specificity of the monoclonal antibodies

To examine the specificity of anti-T-2 toxin monoclonal antibodies, the extent the binding reaction of each of the monoclonal antibodies to T-2-HS-OVA is inhibited by T-2 toxin and its analogs was examined.

Determination was carried out according to the method described in Example 1 "(6) Selection of hybridoma".

T2.1 monoclonal antibody produced by T2.1 is strongly inhibited by T-2 toxin but not so by HT-2. Cross reactivity is a relative binding inhibitory activity obtained from the formula:

$$\text{Relative binding inhibitory activity} = B/A$$

(wherein A is the concentration of T-2 toxin analogs required for 50% inhibition of the binding of T-2-HS-OVA to the antibody of the present invention; and B is the concentration of T-2 toxin required for 50% inhibition of the binding of T-2-HS-OVA to the antibody of the present invention)

expressed in percentage. From the figure, the cross reactivity relative to HT-2 is found to be:

$$\text{Cross reactivity} = (\text{about } 1 \text{ ng/assay})/(\text{about } 30 \text{ ng/assay}) \times 100 = \text{about } 3\%$$

T2.1 monoclonal antibody is not inhibited by either neosolaniol or deoxynivalenol at all.

The detection sensitivity of T-2 toxin by ELISA using T2.1 antibody was about 25 pg/assay (see Fig.).

Similar assay results were obtained for other monoclonal antibodies.

[Effect of the Invention]

The novel monoclonal antibodies obtained by the present invention react specifically with T-2 toxin but almost not with other T-2 toxins. Therefore, they enable accurate assay for T-2 toxin with high specificity.

Furthermore, in the present invention, while the monoclonal antibodies are produced using hybridomas, if the hybridomas are kept incubated, the monoclonal antibodies are available whenever necessary. Moreover, since those with uniform property can be obtained, it is not necessary to prepare a hapten-antigen every time animals are immunized and antibodies with stable quality are always available without undergoing the influence of individual difference of animals.

Brief Description of Drawing

The Figure shows the results of examining the cross reactivity of T2.1 monoclonal antibody with T-2 toxin, HT-2 and neosolaniol.

